

Abschlussbericht zum DBU-geförderten Projekt

**Entwicklung eines
Fermentationsverfahrens für die
L-Fucose Herstellung**

Bei der Jennewein Biotechnologie GmbH, Maarweg 32
in D-53619 Rheinbreitbach

Dr. Marcus Ludwig, Dr. Benedikt Engels, Dr. Katja Parschat und
Dr. Stefan Jennewein

Aktenzeichen 30813/32

Projektbeginn: 1 Juni 2013

Laufzeit: 2 Jahre

Rheinbreitbach, 2016

Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt

Az **30813/32**

Referat

Fördersumme

Antragstitel **Entwicklung eines Fermentationsverfahrens für die L-Fucose Herstellung****Stichworte**

Laufzeit

Projektbeginn

Projektende

Projektphase(n)

2 Jahre**01. Juni 2013**

Abschlussbericht

Bewilligungsempfänger Jennewein Biotechnologie GmbH
Maarweg 32
D-53619 Rheinbreitbach

Tel 02224-9894501

Fax 02224-9880854

Projektleitung

Dr. Stefan Jennewein

Bearbeiter

Kooperationspartner keine***Zielsetzung und Anlass des Vorhabens***

Heute wird L-Fucose ausschließlich aus maritimen Braunalgen in einem äußerst ineffizienten Prozess gewonnen. Dabei werden ca. 40 Tonnen Tang für die Gewinnung von einem 1 kg L-Fucose benötigt. Die Gewinnung von L-Fucose aus Kelpwäldern stellt somit eine erhebliche Belastung maritimer Ökosysteme dar. Diese Belastung begründet sich zum einen durch die Entfernung von Kelpwäldern, zum andern durch die Verwendung toxischer Chemikalien wie Bleicarbonat oder Bariumacetat in der Extraktion von L-Fucose aus den Braunalgen. Zielsetzung des Vorhabens ist es, einen bakteriellen Fermentationsprozess zu entwickeln, der das existierende Extraktionsverfahren aus maritimen Braunalgen und mögliche chemische Synthesewege ersetzt. Mittels Metabolic Engineering und modernen Stammverbesserungsmethoden soll ein *E. coli*-basierter Fermentationsprozess für die L-Fucose Produktion entwickelt werden.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Die Durchführung dieses Projekts umfasste den Aufbau von L-Fucose-produzierenden *E. coli* Stämmen, wobei parallel zwei verschiedene Herangehensweisen verfolgt wurden. In einem Stamm sollte die L-Fucose durch Abspaltung eines transient fucosylierten externen Akzeptormoleküls freigesetzt werden, in einem zweiten durch direkte Hydrolyse von GDP-Fucose. Dabei kamen Methoden zur Deletion von Genen, zur Insertion von Expressionskassetten und Plasmid-basierte Expressionssysteme sowie randomisierte Enzym-Mutagenesen zum Einsatz. Die Produktionsstämme sollten in einer Fed-Batch Fermentation kultiviert werden, und Proben davon sollten mittels Transcriptomics, Proteomics und Metabolit-Analysen untersucht werden, um Bottlenecks im Stoffwechselweg zum Produkt L-Fucose ausfindig zu machen. Mit Hilfe dieser Daten sowie einem weiteren rationalen Stammdesign sollten die im ersten Arbeitsabschnitt dieses Projekts generierten Produktionsstämme verbessert werden, um höhere Produktausbeuten zu erzielen. Dies erfolgte über bereits erwähnten Methoden, zusätzlich aber auch über eine neue Methode mittels Resistenzmarker-freier Selektion auf Mutationen im Genom. Neben einer gezielten Mutagenese wurde auch eine unspezifische Mutagenese durchgeführt, und es wurden Klone in einem Massenscreening identifiziert, welche einen höheren Produkttiter aufwiesen. Ein weiterer Teil dieses Projekts war schließlich eine Verbesserung einer Aufarbeitungsmethode für L-Fucose aus Kulturüberstand.

Ergebnisse und Diskussion

Der L-Fucose-Produktionsstamm, welcher einen externen Fucosylakzeptor nutzt und die L-Fucose daraus in einem weiteren Schritt freisetzt (Stamm #1011), wurde relativ frühzeitig im Projekt fertig, und deshalb wurde dieser Stamm für die weitere Verbesserung genutzt. Ein Stamm, mit dem L-Fucose aus einer direkten Hydrolyse von GDP-Fucose freigesetzt werden kann, wurde im Rahmen des Projekts auch fertiggestellt, eine weitere Verbesserung dieses Stammes war allerdings aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich.

Über Transkriptomanalysen, Targeted Proteomics und Metabolitanalysen konnte für einige Stellen im Zellstoffwechsel gezeigt werden, dass diese im L-Fucose-Produktionsstamm bezüglich der Produktbildung problematisch sind. Zusätzlich zu diesen Methoden wurden vergleichende Genomanalysen durchgeführt, um Zielgene für die weitere Stammverbesserung zu identifizieren. Für diese Zielgene sowie einige aus dem Zellstoffwechsel offensichtliche Zielgene wurde über ein Knock-Down-System versucht, den Expressionslevel zu erniedrigen. Dabei konnte für ein Knock-Down-Konstrukt eine deutliche Steigerung des Produkttiters im Ausgangsstamm #1011 erreicht werden. Eine noch größere Steigerung des Produkttiters zeigte wurde durch eine weitere Gen-Inaktivierung.

Parallel zu diesem rationalen Stammentwicklungsansatz wurde eine ungerichtete Mutagenese durchgeführt, und die resultierenden Klone wurden auf Produktbildung gescreent. Über diesen Ansatz wurde ein Stamm erhalten (#1536), der einen Titer von L-Fucose im Kulturüberstand von bis zu 40 g/L bei einer Fermentationsdauer von 85 bis 90 h erreichte. Mit dieser Produktkonzentration ist bereits eine kostendeckende L-Fucoseproduktion im größeren Maßstab möglich. Basierend auf diesem Stamm wurde ein Bakteriophagen-resistenter Sicherheitsstamm generiert, welcher allerdings nicht mehr diesen Produkttiter erreicht. Es wurde weiterhin versucht, die Genexpression auf Ebene der Proteinbiosynthese zu beeinflussen, und zwar über eine Veränderung der Ribosomenbindstelle. Dies wurde über Rekombination mit Oligonukleotiden versucht, wobei 12 Gene, die über Transkriptomics, Proteomics bzw. Metabolitanalysen identifiziert wurden, gleichzeitig adressiert wurden. Die resultierenden Klone wurden anschließend in einem großen Screening getestet, und es konnten etliche Klone identifiziert werden, die einen erhöhten Produkttiter erreichten. Da diese Stämme allerdings auf dem Sicherheitsstamm basieren, welcher eine schlechtere Produktbildung zeigte, ist eine erhebliche Produktionssteigerung unwahrscheinlich, was zum Abschluss des Projekts allerdings noch nicht überprüft war. Basierend auf den Erkenntnissen über Knock-downs und Veränderung der Ribosomenbindstellen soll nach Ablauf des Projekts eine Weiterentwicklung des bislang besten L-Fucose-Produktionsstamms #1536 erfolgen, um die Ausbeute im Fermentationsprozess weiter zu verbessern.

Neben der L-Fucose Produktion an sich wurde auch versucht, die Aufarbeitung zu verbessern. Da im Hinblick auf ein Upscaling aus Kostengründen auf Simulated-Moving-Bed Chromatography verzichtet werden musste, wurden Ansätze zur Verminderung des Lösungsmittelverbrauchs im Aufarbeitungsprozess getestet.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

- Präsentation des Projekts auf der Messe Biotechnica in Hannover auf dem Stand der DBU.
- Herausgabe einer Broschüre über das Projekt im Rahmen der Präsentation auf der Biotechnica in Hannover auf dem Stand der DBU.
- Patent: PCT/EP 2016/051919 ‚Fermentation process for producing monosaccharides in free form from nucleotide-activated sugars‘

Fazit

Die Arbeiten in diesem Projekt wurden größtenteils wie ursprünglich geplant durchgeführt. Es wurden beide verfolgten Ansätze zur Fermentation von freier L-Fucose erfolgreich umgesetzt, wobei sich für die weitere Stammverbesserung auf eine Linie festgelegt wurde, und damit ein Stamm generiert werden konnte, der eine kommerzielle Produktion von L-Fucose bereits zulässt. Im Rahmen des Projekts wurden Genom-, Transkriptom-, Proteom- und Metabolomanalysen erfolgreich durchgeführt, und die Ergebnisse daraus kamen im Rahmen der Stammentwicklung unterstützend zur Anwendung. Basierend auf den in diesem Projekt erhaltenen Daten wird auch weiterhin an der Stamm- und Prozessoptimierung gearbeitet, um die umweltbelastende Gewinnung aus maritimen Braunalgen schließlich überflüssig zu machen.

Inhalt

Anlass und Zielsetzung des Projekts.....	1
Arbeitspakete und Methoden	3
Arbeitspaket 1	3
Arbeitspaket 2	4
Arbeitspakete 3 bis 6.....	4
Ergebnisse und Diskussion	5
Arbeiten zum Arbeitspaket 1	5
Arbeiten zum Arbeitspaket 2	8
Abschließende Diskussion	13
Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation.....	15
Fazit	15
Literatur.....	16
Anhang	18

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	6
Abbildung 2	7
Abbildung 3	8
Abbildung 4	9
Abbildung 5	10
Abbildung 6	11
Abbildung 7	12

Zusammenfassung

Der Zucker Fucose spielt als Bestandteil von Oligosacchariden in der Zell-Zell-Kommunikation und Erkennung eine bedeutende Rolle. Diese Eigenschaft macht diesen Zucker als Ausgangsprodukt für weitere Synthesen oder direkt als Monosaccharid interessant für die Anwendung als Therapeutikum oder für Kosmetika. Gegenwärtig wird Fucose aus marinen Braunalgen gewonnen, was mit einer erheblichen Belastung mariner Ökosysteme verbunden ist, da die Ausbeute des Extraktionsprozesses nur sehr niedrig ist (für die Gewinnung von 1 kg Fucose werden etwa 40 t Seetang benötigt). Ferner sind für diesen Extraktionsprozess der Einsatz organischer Lösungsmittel und schwermetallhaltiger Substanzen erforderlich, was eine weitere Umweltbelastung nach sich zieht. Da chemische Synthesen in jedem Fall einen mehrstufigen Prozess erfordern und die Ausbeuten sehr niedrig sind, bieten diese keine kompetitive Alternative zur Extraktion aus Braunalgen.

In diesem Projekt war es das Ziel, Fucose biotechnologisch über einen fermentativen Prozess aus gut verfügbaren Ressourcen herzustellen. Dazu wurde ein *Escherichia coli* Stamm durch Metabolic Engineering so verändert, dass dieser Stamm mit Glycerin als C-Quelle L-Fucose synthetisieren und an das Kulturmedium abgeben kann. Durch weitere und tiefer gehende Untersuchungen an diesem Stamm über Genomics, Transcriptomics, Targeted Proteomics und Metabolit-Analysen sowie verschiedene Methoden zur Stammverbesserung konnte dieser L-Fucose-Produktionsstamm so weit verbessert werden, dass schon mit dem am Ende dieses Projekts bestehenden Stamm L-Fucose in großem Maßstab und zu kompetitiven Kosten produziert werden kann.

Die weiteren im Rahmen dieses Projekts entwickelten Methoden und gewonnenen Daten erlauben zudem eine Weiterentwicklung des bestehenden L-Fucose-Produktionsstammes sowie den Aufbau weiterer Stammlinien, welche die Möglichkeit für einen vereinfachten Fermentationsprozess bieten. Die hier entwickelte Daten- und Methodenbasis bietet darüber hinaus eine wertvolle Grundlage für die Entwicklung von Produktionsstämmen für andere Mono- und Oligosaccharide, insbesondere der humanen Milcholigosaccharide, welche von der Jennewein Biotechnologie GmbH bereits produziert werden oder noch produziert werden sollen.

Anlass und Zielsetzung des Projekts

Kohlenhydrate sind mit großem Abstand die wohl heterogenste wie auch die am mannigfaltigste genutzte Substanzklasse der belebten Welt. Neben den weitläufig bekannten Kohlenhydraten Saccharose (Rohrzucker) und Lactose (Milchzucker) synthetisiert die Natur eine kaum überschaubare Diversität an weiteren Zuckern. Neben der Funktion als Energieträger (z.B. in Form von Stärke), Strukturmolekülen (z.B. Zellulose & Chitin) oder Sekundärstoff erfüllen Oligo- und Polysaccharide weithin unbemerkt zentrale Funktionen in der molekularen Erkennung. Mono- und Oligosaccharide sind von zentraler Bedeutung in vielen Bereichen der zellulären Kommunikation und Erkennung. Neben der zelleigenen Erkennung spielen Oligosaccharide auch eine zentrale Rolle in der Wirts-Pathogen-Erkennung. Es wird vermutet, dass ca. 70% aller humanen Pathogene Oligosaccharide als Rezeptor oder Co-Rezeptor für ihre Infektion verwenden. Auch werden Oligosacchariden in der Metastasierung von Tumoren eine entscheidende Bedeutung zugesprochen. Die herausragende Bedeutung von Mono- und Oligosacchariden wird uns meistens nur durch sehr seltene Erkrankungen anschaulich vor Augen geführt. So beruht z. B. die seltene Erbkrankheit Leukozyten-Adhäsions-Defizienz II auf einer Beeinträchtigung in der Synthese zellulärer fucosylierter Oligosaccharide, welche zu Immundefizienz, geistiger Retardierung, motorischen Defekten und zu starker Wachstumsverzögerung führt (Wild et al., 2002). Durch die orale Gabe des Monosaccharids L-Fucose können die Neutrophilie und der Immundefekt dieser Erkrankung vollständig aufgehoben werden. Die Bedeutung von Oligosacchariden und Monosacchariden werden heute zunehmend in Produkte umgesetzt, so stellen heute Oligosaccharide wie Fucodiane oder das Monosaccharid L-Fucose neue vielversprechende funktionelle Wirkstoffe in der Kosmetik dar (Isnard et al., 2004; 2005; Robert et al., 2004). L-Fucose oder Fucose-reichen Oligosacchariden werden hier antiinflammatorische und wundheilende Eigenschaften sowie antiallergische Eigenschaften zugesprochen. Neben den kosmetischen Anwendungsgebieten wird L-Fucose auch für die vorbeugende Behandlung von Patienten mit zystischer Fibrose zugelassen. Die Gabe von L-Fucose inhibiert hierbei die Infektion der Atemwege durch *Pseudomonas aeruginosa* (Adam et al., 1997; Hauber et al., 2008).

Technisch werden heute nahezu alle Monosaccharide mittels Extraktion aus der Natur gewonnen. Für einige Monosaccharide stehen jedoch keine guten bzw. ausreichenden Quellen zur Verfügung, diese Monosaccharide werden dann ggf. ausgehend von anderen Monosacchariden synthetisch hergestellt. Sowohl die Extraktion aus natürlichen Quellen wie

auch die chemische Konversion sind wegen des Einsatzes toxischer Chemikalien und des exzessiven Lösungsmitelesinsatzes verbesserungswürdig. L-Fucose stellt einen dieser Monosaccharide dar, welcher heute hauptsächlich aus Braunalgen gewonnen wird, was neben dem Einsatz großer Volumina an giftigen Lösungsmitteln (Methanol, konzentrierte Salzsäure sowie Lösungen von Blei- und Bariumsalzen) bei einer relativ geringen Ausbeute von etwa 10% (Schweiger, 1966) auch einen starken Eingriff in die Kelp-Wälder in den Uferzonen der Meere nach sich zöge. So werden im herkömmlichen Verfahren für die Gewinnung von 1 kg L-Fucose etwa 40 t Seetang benötigt, was nicht nur einen hohen Preis für das Monosaccharid zur Folge hat (zirka 1000 Euro pro Kilogramm vor Beginn des Projekts), sondern auch – zumindest im größeren Maßstab - einen erheblichen Eingriff in das marine Ökosystem bedeutet. Es wurden auch chemische Syntheseverfahren für L-Fucose ausgehend von verwandten Monosacchariden entwickelt, welche sich jedoch als kaum konkurrenzfähig gegenüber der Extraktion aus Seetang erwiesen. L-Fucose wurde bislang aus L-Arabinose (Ausbeute 1% in 9 Stufen), aus D-Galactose (15%, 4 Stufen) (Dejter-Juszynski und Flowers, 1973), D-Glucose (19%, 5 Stufen) (Chiba und Tejima, 1979), D-Mannose (55%, 6 Stufen) (Defaye et al., 1981) mit großem Aufwand und geringen Ausbeuten synthetisiert. Eine Ausnahme stellt hier der Syntheseweg von Defaye et al., (1984) dar, mit welchem die 6-Deoxy-L-Talose (ein synthetischer Vorläufer der L-Fucose) ausgehend von L-Rhamnose in 5 Stufen mit relativ guter Ausbeute erhalten wird.

Der hohe Preis für das Monosaccharid schränkt dabei zumindest zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch das Anwendungsspektrum dieses vielversprechenden Monosaccharids ein. Aus diesen Gründen ist es erforderlich andere Verfahren einzusetzen, um L-Fucose nicht nur in größeren Mengen, sondern auch kostengünstiger produzieren zu können. Ziel dieses Projekts war es daher, erstmalig ein Bakterium durch Metabolic Engineering so zu modifizieren, dass damit ein effizienter und technisch konkurrenzfähiger Fermentationsprozess für die exklusive Totalfermentation freier L-Fucose möglich ist. Dabei sollte eine gute und ausreichend verfügbare C-Quelle, wie z.B. Glycerin, verwendet werden, so dass dieser Prozess eine umweltfreundliche Alternative zu der heute praktizierten Extraktion von L-Fucose aus maritimen Braunalgen oder zu den chemischen und chemoenzymatischen Syntheseverfahren darstellen würde. Eine solche Entwicklung wäre durch den Wegfall aufwendiger Synthesen und Aufarbeitungsverfahren ein bedeutender Beitrag in der Entlastung der Umwelt im Allgemeinen und durch den Wegfall der Nutzung von Seetang im Schutz maritimer Ökosysteme im Speziellen.

Arbeitspakete und Methoden

Die Durchführung dieses Projekts gliederte sich in sechs Arbeitspakete, zwei dieser Arbeitspakete umfassen den Aufbau von L-Fucose-produzierenden Stämmen. Zwei weitere Arbeitspakete umfassen die Analyse der L-Fucose-Produktionsstämme mittels Screening Methoden für das Transkriptom, für das Proteom sowie für bestimmte Metabolite, um darüber Bottlenecks im Metabolismus, insbesondere in der Umsetzung der C-Quelle zum Produkt aufzuspüren. Aus diesen Ergebnissen wurden dann Ansatzpunkte für eine weitere Optimierung der Stämme aus den vorherigen Arbeitspaketen genommen. Schließlich umfasst das letzte Arbeitspaket die Optimierung der Extraktion und Aufarbeitung der L-Fucose aus dem Kulturüberstand. Im Folgenden sind die Arbeitspakete und die im Rahmen dieser Arbeitspakete angewandten Methoden aufgelistet:

Arbeitspaket 1

Im Rahmen des Arbeitspakets 1 wurden in einem Ausgangsstamm (*Escherichia coli* BL21 (DE3)) eine Reihe von Genen inaktiviert. Hierfür wurden Methoden benutzt, welche auf homologer Rekombination beruhen, wobei das entsprechende Zielgen durch einen Antibiotika-Resistenzmarker ersetzt wird (Datsenko und Wanner, 2000). In einem zweiten Schritt wird dieser Resistenzmarker wieder entfernt, wobei die Deletion des Zielgens erhalten bleibt. Eine weitere Methode, welche hier benutzt wurde, war die Inaktivierung eines Gens durch Modifikation eines Codons in ein Stop-Codon mittels geeigneter Oligonukleotide. Dabei wurde hier phänotypisch auf die eingefügte Mutation selektiert und kein Resistenzmarker verwendet. Neben der Deletion bestimmter Gene, um ungewünschte Stoffwechselreaktionen zu unterbinden, war es nötig, zusätzliche Gene in den Wirtsstamm zu integrieren, da *E. coli* von sich aus nicht das gewünschte Produkt L-Fucose bilden kann. Für diese Integrationen wurden drei verschiedene Methoden angewandt. Eine Insertion wurde ortsspezifisch über homologe Rekombination durchgeführt, während für alle anderen Rekombinationssysteme verwendet wurden, welche eine unspezifische Insertion in das Genom erlauben. Dabei wurden sowohl die Himar-Typ Transposase *Himar1* (Lampe et al., 1999) verwendet, die auch Mehrfachintegrationen zulässt, als auch die EZ::Tn5TM Transposase (Epicentre, Madison, USA), welche im Regelfall zu einfachen Integrationen führt. Die resultierenden Stämme wurden nach dem jeweiligen Arbeitsschritt auf das Vorhandensein der jeweiligen Veränderung hin überprüft und es wurde – wenn möglich – ein

Funktionalitätstest auf L-Fucose-Produktion durchgeführt. Bei den in diesem Arbeitspaket durchgeführten Modifikationen war es schließlich das Ziel, Fucosylgruppen zu generieren, diese auf ein Akzeptorsubstrat zu übertragen und von diesem schließlich wieder freizusetzen, so dass letztendlich L-Fucose frei im Kulturüberstand vorlag.

Arbeitspaket 2

Ähnlich wie in Arbeitspaket 1 war es im Rahmen dieses Arbeitspakets das Ziel, einen Stamm zu generieren, welcher L-Fucose in den Kulturüberstand frei setzt. Anders als beim Stammdesign in Arbeitspaket 1 sollte hier eine direkte Freisetzung der Fucosylgruppe von der GDP-Fucose ohne intermediäre Übertragung auf ein Akzeptorsubstrat erfolgen. Die Methoden für das Stammdesign (also Deletion bzw. Insertion von Genen) erfolgte nach den gleichen Methoden wie für Arbeitspaket 1 beschrieben, bzw. es wurden zum Teil die gleichen Vorläuferstämme benutzt. Für die Hydrolyse von GDP-Fucose wurde sich hier der Nebenaktivität von Fucosyltransferasen – nämlich der GDP-Fucose-Hydrolyse – bedient. Es wurden Datenbanksuchen nach Fucosyltransferase-Gene aus unterschiedlichen Organismen durchgeführt. Vielversprechende Kandidaten-Gene wurden entweder über PCR von genomischer DNA aus den entsprechenden Organismen amplifiziert oder als synthetische und Codon-optimierte zugekauft (GenScript Cooperation, Piscataway, USA). Die entsprechenden Gene wurden Plasmid-basiert in geeigneten GDP-Fucose-Donor-Stämmen exprimiert und der Level L-Fucose im Kulturüberstand bestimmt. Neben dem Testen verschiedener Fucosyltransferasen fand eine Mutagenese der im Arbeitspaket 1 verwendeten Fucosyltransferase über Error-Prone PCR statt, und die mutagenisierten, Plasmid-codierten Enzyme wurden auf L-Fucose-Freisetzung getestet.

Arbeitspakete 3 bis 6

Der Inhalt bzw. die Ergebnisse dieser Kapitel sind patentrechtlich noch offen. Daher wurden diese Kapitel aus der vorläufig veröffentlichten Version des Abschlussberichts entfernt.

Ergebnisse und Diskussion

Arbeiten zum Arbeitspaket 1

L-Fucose kommt in der Natur und im Besonderen in Mikroorganismen nicht in freier Form vor. Das Vorkommen des seltenen Monosaccharides Fucose beschränkt sich somit auf Glycostrukturen (Oligosaccharide, Glykoproteine, Glykolipide) in welchen die Fucose zudem oftmals nur einen kleinen Anteil an der Gesamtstruktur ausmacht. Für die Synthese dieser Glycostrukturen verwenden Zellen Fucose in der Form von nukleotidaktivierter GDP-Fucose, welche als Substrat für die jeweiligen Fucosyltransferasen dient. Die stationäre Menge an GDP-Fucose in Zellen ist jedoch sehr gering da die Bereitstellung von GDP-Fucose einer starken Feedback-Regulierung unterliegt. Die Feedback-Regulation erfolgt hier auf der Ebene des Enzyms GDP-Mannose-Dehydratase, welches die Umsetzung von GDP-Mannose in GDP-4-Keto-6-Deoxymannose katalysiert und durch das *E. coli* Gen *gmd* kodiert wird.

Das Arbeitspaket 1 befasste sich mit der Erstellung eines L-Fucose synthetisierenden Stamms auf Basis der Fucosylierung eines geeigneten Akzeptorsubstrats und dessen Defucosylierung. Dieser Ansatz, in Verbindung mit der Unterbindung des Fucose Katabolismus sollte die Akkumulation von freier Fucose ermöglichen. Dazu wurden in einem ersten Schritt die Gene *fucI* und *fucK*, kodierend für die Fucose-Isomerase, bzw. die Fuculose-Kinase in *E. coli* BL21 deletiert. Damit konnte der Abbau von L-Fucose in dem Stamm unterbunden werden.

Für die verbesserte Bereitstellung der benötigten GDP-Fucose wurden in diesem Stamm Teile des GDP-Fucose Pathways bestehend aus den Genen *manB* (Phosphomannomutase), *manC* (Mannose-1-Phosphat Guanylyltransferase), *gmd* (GDP-Mannose-4,6-Dehydratase) und *wcaG* (GDP-4-keto-6-deoxy-D-Mannose-3,5-Epimerase-4-Reduktase) überexprimiert.

Als Fucosyltransferase, verantwortlich für die Fucosylierung des Akzeptorsubstrats wurde die 2'-Fucosyltransferase *wbgL* aus *E. coli*:O126 verwendet, welche ebenfalls wie die Gene des GDP-Fucose Biosynthesewegs in das Genom des verwendeten *E. coli* BL21 (DE3) Stamms integriert wurde.

Als Substrat wurde zunächst Lactulose verwendet, da dieses das bevorzugte Akzeptorsubstrat der 2'-Fucosyllactose darstellt. Neben der Lactulose kann ebenfalls die Lactose als Substrat verwendet werden, welche nur geringfügig schlechter als die Lactulose als Akzeptorsubstrat von der Fucosyltransferase verwendet wird.

Durch die Einbringung der α -1,2-L-Fucosidase (*AfcA*) aus *Bifidobacterium bifidum* JCM1254 wird nun die entstehende 2'-Fucosyllactulose zu Fucose und Lactulose abgebaut, die Lactulose steht somit dann einer weiteren Fucosylierung zur Verfügung. Das *afcA* Gen wurde ebenfalls genomisch in dem verwendeten *E. coli* Stamm verankert. Der erstellte Stamm wurde #1011 genannt und dient nun als Grundlage für weitere Experimente in den folgenden Arbeitspaketen (Abbildung 1).

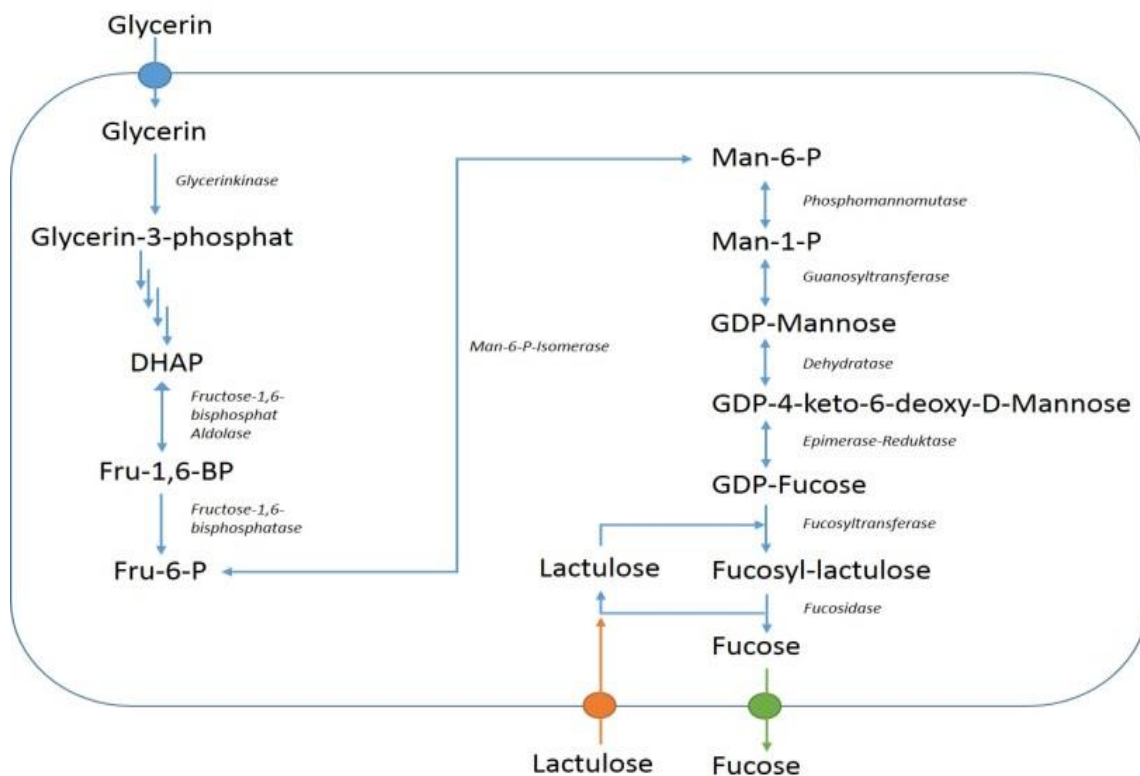


Abbildung 1

Schematische Darstellung des Fucosebiosyntheswegs im modifizierten *Escherichia coli* BL21 Stamm (#1011) mit Nennung der Intermediate und der beteiligten Enzyme. Die Importer für Glycerin als Kohlenstoffquelle und Lactulose als GDP-Fucose-Akzeptor bzw. der Exporter für Fucose sind als Punkte in der Zellmembran dargestellt. DHAP: Dihydroxyacetonphosphat; Fru-1,6-BP: Fructose-1,6-bisphosphat; Fru-6-P: Fructose-6-phosphat; Man-6-P: Mannose-6-phosphat; Man-1-P: Mannose-1-phosphat; GDP: Guanyldiphosphat.

In ersten Fermentationsversuchen konnten mit dem erstellten Stamm #1011 schon gute Fucose-Syntheseraten erzielt werden. Mit Glycerin als C-Quelle mit Lactulose als eingesetztes Akzeptorsubstrat Titer von bis zu 13 g/l L-Fucose in einer 3 tägigen Fermentation erzielt werden (Abbildung 2). Die Arbeiten am Arbeitspaket 1 sind durch die

Erstellung des Fermentationsstamms abgeschlossen. Der erstellte Stamm soll nun in den nachfolgenden Arbeitspaketen analysiert und die Ausbeute weiter verbessert werden.

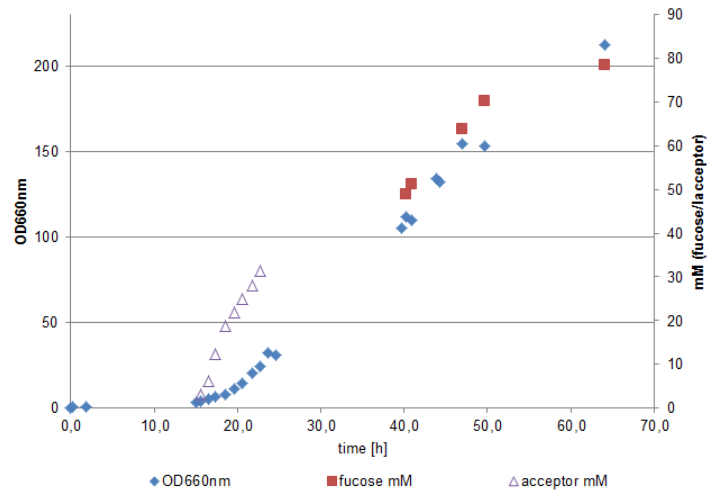


Abbildung 2

Die Abbildung zeigt den Fermentationsverlauf der L-Fucose Fermentation mit dem durch Metabolic Engineering erhaltenen *E. coli* Stamm #1011. Als Akzeptorsubstrat wurde Lactulose und als C-Quelle Glycerin verwendet.

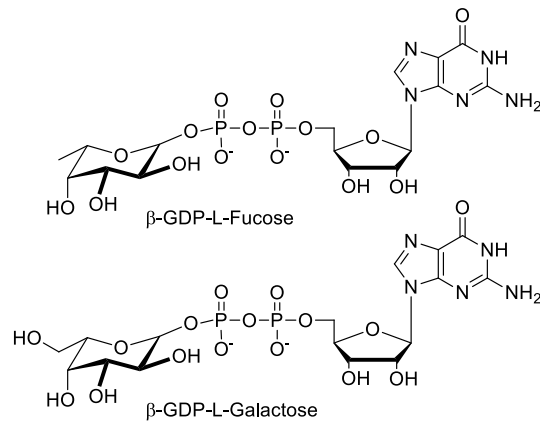
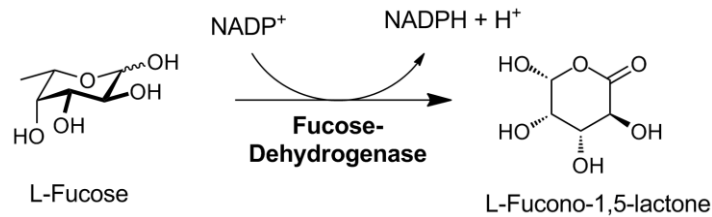


Abbildung 4

Die Abbildung zeigt die strukturell sehr ähnlichen Verbindungen GDP-L-Fucose (GDP-6-Deoxy-L-Galactose) und die GDP-L-Galactose.

Eine weitere Möglichkeit, welche im Arbeitspaket 2 untersucht wurde, stellte die Hydrolyse von Nukleotid-aktivierten Zuckern durch Glycosyltransferasen in Abwesenheit eines geeigneten Akzeptor Substrats dar. Über geringe GDP-L-Fucose Hydrolyseaktivitäten der *Helicobacter pylori* α -1,2-Fucosyltransferase wurde in der Literatur schon berichtet (Stein et al., 2008). Zunächst wurde das *Helicobacter pylori* Gen *futC* kodierend für die α -1,2-Fucosyltransferase in *E. coli* überexprimiert und der Rohextrakt auf GDP-Fucose Hydrolaseaktivität getestet. Neben der *H. pylori* α -1,2-Fucosyltransferase *futC* wurde ebenfalls unsere *E. coli* α -1,2-Fucosyltransferase *wbgL* in den Versuchen verwendet (ebenfalls subkloniert und heterolog exprimiert). In beiden Fällen konnte mittels eines colometrischen Assays mit Rohextrakt eine Freisetzung von geringen Mengen von L-Fucose aus GDP-Fucose beobachtet werden. Als colometrischer Assay wurde ein Testsystem auf Basis der Fucose-Dehydrogenase verwendet (Abbildung 5).

A



B

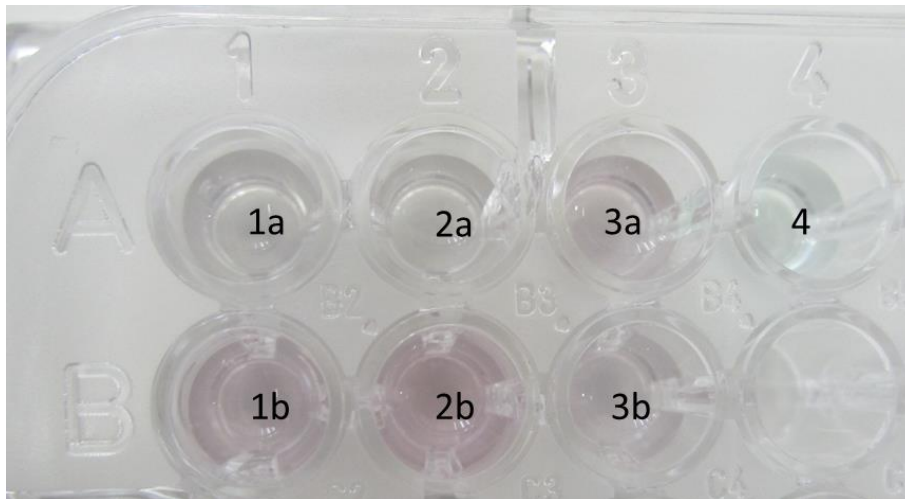


Abbildung 5

A.) Prinzip der Fucose-Dehydrogenase Reaktion. L-Fucose wird durch das Fucose-Dehydrogenase Enzym zu L-Fuconolacton oxidiert, gleichzeitig erfolgt in der Reaktion die Reduktion von NADP^+ zu NADPH . Das NADPH kann mittels verschiedener in der Enzymatik gut etablierten Test qualitativ und quantitativ detektiert werden (wie dem hier verwendeten NBT/PMS). **B.)** Resultat des *in vitro* Fucose-Dehydrogenase Farbtests in welchem jeweils 5 mM GDP-Fucose verwendet wurden. In den Proben markiert 1a, 1b, 2a und 2b wurde jeweils 1,5 mg Rohextrakt einer *E. coli* Expression des *H. pylori futC* Gens verwendet in den Proben 3a und 3b wurden 1,5 mg löslicher Rohextrakt erhalten aus einer *E. coli* Expression des *wbgL* Gens verwendet. Die Proben mit Zusatz **a** wurden 6 Stunden nach Induktion der jeweiligen Fucosyltransferase-Expression mit IPTG verwendet, Proben markiert mit dem Zusatz **b** wurden 20 Stunden post IPTG Induktion geerntet. Probe 4 stellt die Negativkontrolle dar.

Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, setzen beide Fucosyltransferasen in Abwesenheit eines geeigneten Akzeptors *in vitro* geringe Mengen an L-Fucose frei.

Basierend auf einem geeigneten und vorhandenen *E. coli* Stamm wurde dann ein *in vivo* Testsystem etabliert. Hierfür wurde ein vorhandener Vorläuferstamm mit inaktivierterem Fucose Katabolismus verwendet, in welchem die Gene codierend für die L-Fucose Isomerase (*fucI*), L-Fucolose Kinase (*fucK*) mit der Methode von Datsenko und Wanner (2000) deletiert wurden. Ebenfalls wurde das *wcaJ* Gen, beteiligt an der Colanic acid Biosynthese, aus dem

Genom des *E. coli* BL21 Stamms entfernt. Für die verbesserte Bereitstellung des Substrats GDP-Fucose wurden im verwendeten Screeningstamm die Gene des GDP-Fucose Biosynthesewegs (Phosphomannomutase (*manB*), Mannose-1-phosphate-guanosyltransferase (*manC*), GDP-Mannose-4,6-dehydratase (*gmd*), und die GDP-L-Fucose-synthase (*wcaG*)) zusätzlich in das Genom integriert. Für eine Überexpression der GDP-Fucose-Biosynthesegene wurde diese mit einem starken Tetracyclin-Promoter versehen.

Dann wurden jeweils das *wbgL* Gen und das *futC* Gen heterolog im erstellten Teststamm mittels eines Plasmids überexprimiert. Bei beiden heterologen Expressionen konnte im Testsystem (GDP-Fucose bereitstellender *E. coli* Stamm) eine geringe Bildung von freier L-Fucose beobachtet werden.

Um die GDP-Fucose Hydrolyse-Eigenschaften der verwendeten Fucosyltransferasen zu verbessern wurde das *wbgL* Gen codierend für die *E. coli*:O126 α -1,2-Fucosyltransferase einer Error-Prone PCR unterzogen und mehrere hundert Variantenklone mittels des colometrischen Tests auf L-Fucosebildung im Testsystem untersucht. In Abbildung 6 zeigt eine solche „Screening-Platte“. Um die Bildung von freier L-Fucose zweifelsfrei abzusichern wurde der Zellüberstand der aufgefundenen Hits D1 und H2 mittels HPLC und LC/MS nachvermessen, hier konnte zweifelsfrei freie L-Fucose im Überstand nachgewiesen werden (Abbildung 6).

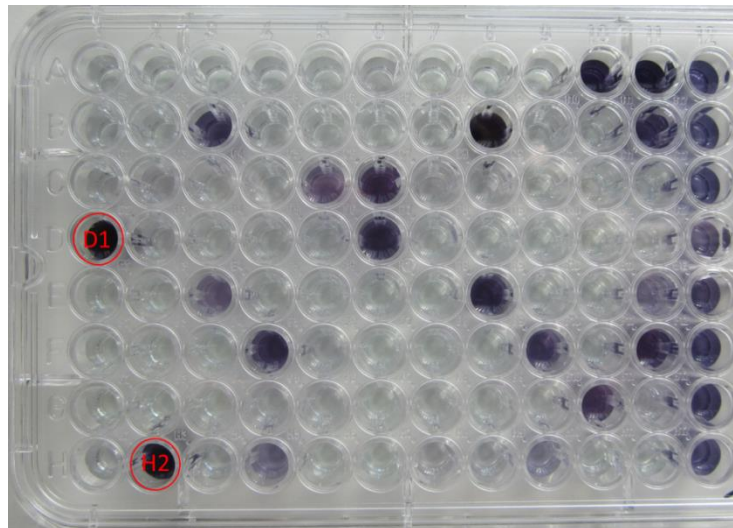


Abbildung 6

Fucose-Dehydrogenase-Test Screening Platte für das Auffinden von *WbgL* Fucosyltransferase-Varianten mit verbesserter GDP-Fucose-Hydrolase-Aktivität. Die Überstände der beiden hier markierten „Hits“ wurden zur genaueren Untersuchung mittels HPLC auf freie L-Fucose im Kulturüberstand nachvermessen (siehe Abbildung 7).

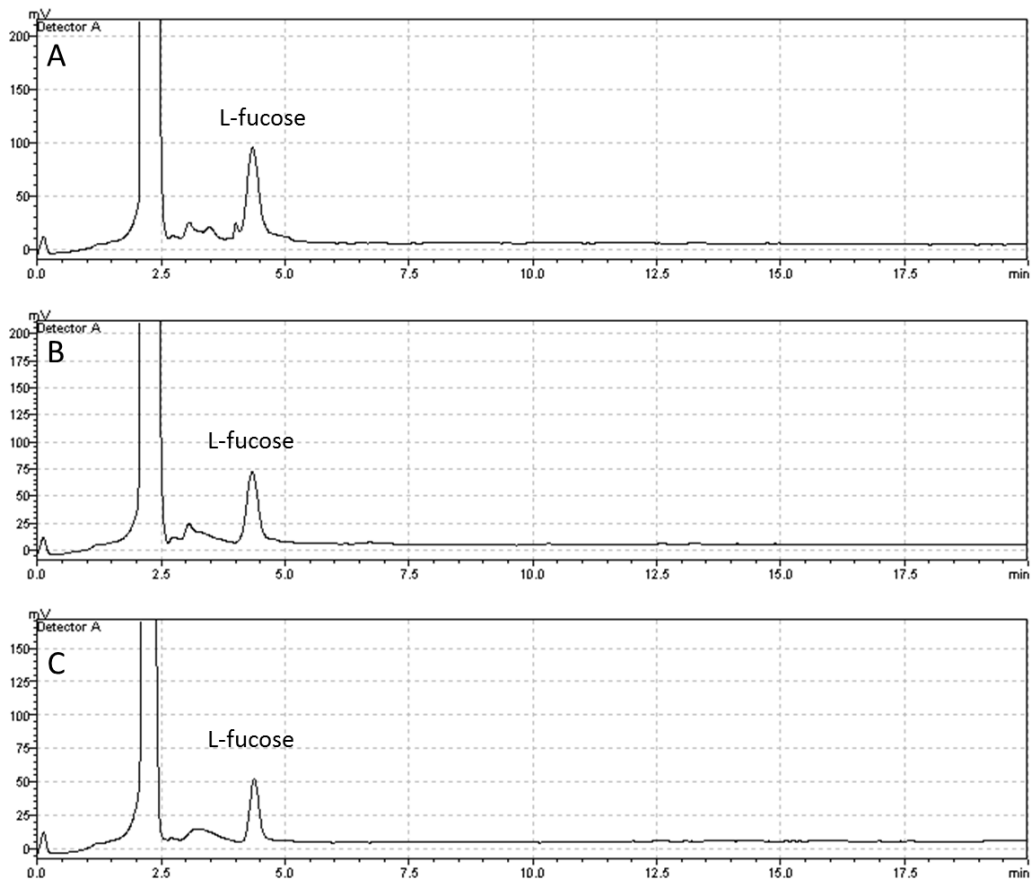


Abbildung 7

Die Abbildung zeigt die HPLC Analyse der im Platten-Screening-Test aufgefundenen Hits D1 (A) und H2 (B) und L-Fucose (Positivkontrolle) (C).

Die Arbeiten zur GDP-Fucose-Hydrolyse als weitere Möglichkeit zur Fermentation freier L-Fucose wurden als Patent unter dem Titel ‚Fermentation process for producing monosaccharides in free form from nucleotide-activated sugars‘ eingereicht. Da die Fermentation durch den in Arbeitspaket 1 beschriebenen Ansatz auf Basis der Fucosylierung und Defucosylierung eines gut verfügbaren Akzeptorsubstrats bereits sehr gute Produktionsraten lieferten, wurde dieser Ansatz für die weiteren Arbeiten zur Stammverbesserung verwendet.

Abschließende Diskussion

Die im Rahmen dieses Projekts durchgeführten Arbeiten waren zum Teil so ausgelegt, dass bestimmte Entwicklungen parallel liefen und nach den jeweiligen Ergebnissen aus den entsprechenden Arbeitspaketen oder Teilpaketen entschieden wurde, welche Strategie (bzw. welche Stammentwicklungslinie) in den nächsten Schritten weiter verfolgt werden sollte. Da der im Arbeitspaket 1 entwickelte L-Fucose-Produktionsstamm (#1011) relativ frühzeitig im Projekt einen akzeptablen Produkttiter erreichte, wurde dieser Stamm als Ausgangsstamm für die weitere Verbesserung genutzt. Der im Arbeitspaket 2 entwickelte Stamm, welcher L-Fucose aus einer direkten Hydrolyse von GDP-Fucose freisetzen kann, wurde hingegen erst zum Ende des Projekts fertig, so dass ein weiterer Aufbau auf diesem Stamm im Projekt nicht mehr möglich war. Dennoch ist dieser Stamm eine interessante Alternative für weitere Entwicklungen, da für die Produktbildung in der Fermentation kein Acceptorsubstrat zugesetzt werden muss, welches in der Produktaufarbeitung letztlich zu Schwierigkeiten führt. Somit lässt sich festhalten, dass sowohl in Arbeitspaket 1 als auch in Arbeitspaket 2 das Ziel einen L-Fucose-produzierenden Stamm zu generieren erreicht wurde.

Durch die Weiterentwicklung des in Arbeitspaket 1 erhaltenen Produktionsstammes konnte im Arbeitspaket 3 der Titer von L-Fucose im Kulturüberstand auf bis zu 40 g/L bei einer Fermentationsdauer von 85 bis 90 h gesteigert werden. Dieser Konzentration des Produktes im Kulturüberstand erlaubt schon eine kostendeckende Produktion von L-Fucose im größeren Maßstab. Der entsprechende Stamm (#1536) wurde durch eine ungezielte Mutagenese erhalten. Parallel dazu wurden basierend auf dem gleichen Ausgangsstamm auch über andere Methoden Steigerungen des Produkttiters erreicht, die allerdings nicht den Endtiter des Stammes #1536 erreichten. Die aus diesen Versuchen stammenden Ergebnisse können jedoch für die gezielte Weiterentwicklung des Stammes #1536 verwendet werden, was zurzeit auch durchgeführt wird, allerdings noch nicht abgeschlossen ist.

Die in den Arbeitspaketen 4 und 5 generierten Daten lieferten wertvolle Erkenntnisse für die Stammentwicklung im Rahmen dieses Projekts und darüber hinaus. Entgegen der ursprünglichen Planung, welche hier Transkriptomics, Proteomics und Metabolitanalysen vorsah, wurden jedoch viele Genomanalysen durchgeführt. Neben den sequenzierten L-Fucose Produktionsstämmen wurden auch Sequenzdaten aus anderen Stammentwicklungsprojekten bei der Jennewein Biotechnologie GmbH herangezogen, soweit diese Stämme auch einer unspezifischen Mutagenese unterworfen worden waren. Aus diesen Daten zusammen mit den Daten aus der Genomsequenzierung von Stamm #1536 wurden Gene extrahiert, die

bevorzugt im Rahmen der unspezifischen Mutagenese getroffen wurden und zu einem erhöhten Produkttiter führten. Aus diesen Daten ergaben sich dann neben den mittels Transkriptomics und Proteomics identifizierten Zielgenen eine Reihe weiterer Zielgene, die im Rahmen des Arbeitspaketes 3 erfolgreich adressiert wurden.

Im Rahmen des Arbeitspaketes 6 war es im Hinblick auf einen hohen Kilogramm- bis Tonnenmaßstab an aufzuarbeitendem Produkt nicht möglich, ein kostengünstiges SMB-basiertes Verfahren zur L-Fucose-Aufarbeitung zu entwickeln. Es wurde stattdessen das bei der Jennewein Biotechnologie GmbH bestehende Kristallisationsverfahren optimiert, um den Lösungsmittelverbrauch zu senken. An dieser Stelle sind allerdings Maßnahmen zur Rückgewinnung von Lösungsmitteln beim Aufbau einer größeren Downstream-Anlage notwendig, die den Rahmen dieses Projekts gesprengt hätten und dadurch – in Form einer größeren Anlage - nicht praktisch ausgeführt werden konnten.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass im Rahmen dieses Projekts ein L-Fucose-Produktionsstamm generiert werden konnte, der die Fermentation auch im großen Maßstab erlaubt. In der Tat wird dieser Stamm genutzt, um bei Vertragspartnern Fermentationen im 100-m³-Maßstab durchzuführen. Dabei erlauben schon die mit dem Stamm #1536 erzielbaren Produkttiter eine kostendeckende Produktion von L-Fucose. Und mit den weiteren im Rahmen dieses Projektes erhaltenen Daten lassen sich die Produktausbeuten sehr wahrscheinlich noch weiter steigern und somit die Produktionskosten für L-Fucose senken. Somit kann dieses Projekt insgesamt als großer Erfolg bezeichnet werden.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Präsentation des Projekts auf der Messe Biotechnica in Hannover auf dem Stand der DBU.

Herausgabe einer Broschüre über das Projekt im Rahmen der Präsentation auf der Biotechnica in Hannover auf dem Stand der DBU.

Patent: PCT/EP 2016/051919 ‚Fermentation process for producing monosaccharides in free form from nucleotide-activated sugars‘

Einige Ergebnisse sollen im Rahmen wissenschaftlicher Publikationen veröffentlicht werden.

Fazit

Die Arbeiten in diesem Projekt wurden größtenteils wie ursprünglich geplant durchgeführt. Es wurden beide verfolgten Ansätze zur Fermentation von freier L-Fucose erfolgreich umgesetzt, wobei sich für die weitere Stammverbesserung auf eine Linie festgelegt wurde, und damit ein Stamm generiert werden konnte, der eine kommerzielle Produktion von L-Fucose zulässt. Im Rahmen des Projekts wurden Genom-, Transkriptom-, Proteom- und Metabolomanalysen erfolgreich durchgeführt, und die Ergebnisse daraus kamen im Rahmen der Stammentwicklung unterstützend zur Anwendung. Obwohl schon jetzt ein guter Produktionsstamm erhalten wurde, ist die Stammentwicklung mit Stamm #1536 noch nicht abgeschlossen, sondern die Arbeiten an einer Stammoptimierung und einer Prozessoptimierung laufen noch weiter.

Literatur

- Adam, E.C., Mitchell, B.S., Schumacher, D.U., Grant, G., and Schumacher, U. (1997) *Pseudomonas aeruginosa* II lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose. *Am. J. Respir. Care Med.* 155:2102-2104.
- Chiba, T., and Tejima, S. (1979) A new synthesis of α -L-fucose. *Chem. Pharm. Bull.* 27, 2838-2840.
- Datsenko, K. A., and Wanner, B. L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR product. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(12):6640-6645.
- Defaye, J., Gadelle, A., and Angyal, S. (1984) An efficient synthesis of L-fucose and L-(4-2H)fucose. *Carbohydr. Res.* 126, 165-169.
- Defaye, J., Gardelle, A., and Wong, C. C. (1981) Synthèse des L-Fucose et L-(3-2H)fucose à partir du D-Mannose. *Carbohydr. Res.* 95, 131-141.
- Dejter-Juszynski, M., and Flowers, H.M. (1973) Synthesis of L-fucose. *Carbohydr. Res.* 28, 144-146.
- Hauber, H.-P., Schulz, M., Pforte, A., Mack, P., Zabel, P., and Schumacher, U. (2008) Inhalation with fucose and galactose for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Int. J. Med. Sci.* 5:371-376.
- Isnard, N., Bourles-Dagonet F., Robert, L., and Renard, G. (2005) Studies on corneal wound healing: Effects of fucose on iodine vapor-burnt rabbit corneas. *Ophthalmologica* 219, 324-333.
- Isnard, N., Fodil-Bourathla, I., Robert A.M., and Robert, L. (2004) Pharmacology of skin aging. Stimulation of glycosaminoglycan biosynthesis by L-fucose and fucose rich polysaccharides, effect of in vitro aging of fibroblasts. *Biomed. Pharmacother.* 58, 202-204.
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., and Marraffini, L. A. (2013) RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol.* 31(3):233-239.
- Killmann, H., Videnov, G., Jung, G., Schwarz, H., and Braun, V. (1995) Identification of receptor binding sites by competitive peptide mapping: phages T1, T5, and phi 80 and colicin M bind to the gating loop of FhuA. *J Bacteriol.* 177(3):694-698.
- Lampe, D. J., Akerley, B. J., Rubin, E. J., Mekalanos, J. J., and Robertson, H. M. (1999) Hyperactive transposase mutants of the Himar1 mariner transposon. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(20):11428-33.

- Man, S., Cheng, R., Miao, C., Gong, Q., Gu, Y., Lu, X., Han, F., and Yu, W. (2011) Artificial trans-encoded small non-coding RNAs specifically silence the selected gene expression in bacteria. *Nucleic Acids Res.* 39(8):e50.
- Robert, L., Fodil-Bourahla, I., Bizbiz, L., and Robert, A.M. (2004) Effect of L-fucose and fucose-rich polysaccharides on elastin biosynthesis, in vivo and in vitro. *Biomed. Pharmacother.* 58:123-128.
- Schweiger, R.G. (1966) Preparation of α -L-fucosides and L-fucose from fucoidan. US Patent 3,240,775.
- Seo, S. W., Yang, J. S., Kim, I., Yang, J., Min, B. E., Kim, S., and Jung, G. Y (2013) Predictive design of mRNA translation initiation region to control prokaryotic translation efficiency. *Metab Eng.* 15:67-74.
- Stein, D. B., Lin, Y.-N., and Lin, C.H. (2008) Characterization of *Helicobacter pylori* α -1,2-fucosyltransferase for enzymatic synthesis of tumor-associated antigens. *Adv. Synth. Catal.* 350(14-15):2313-2321.
- Wang, H. H., Kim, H., Cong, L., Jeong, J., Bang, D., and Church, G. M. (2012) Genome-scale promoter engineering by coselection MAGE. *Nat Methods.* 9(6):591-593.
- Wild, M. K., Lühn, K., Marquardt, T., and Vestweber, D. (2002) Leukocyte adhesion deficiency II: therapy and genetic defect. *Cells Tissues Organs* 172, 161-173.

Anhang

Folgendes Patent wurde im Rahmen dieses Projekts eingereicht:

Patent PCT/EP 2016/051919

“Fermentation process for producing monosaccharides in free form from nucleotide-activated sugars”

Abstract

The present invention relates to a process for producing a monosaccharide, e.g. L-fucose, in free form using a microbial fermentation process. The used microorganism exhibits hydrolase activity on nucleotide-activated sugars and releases the monosaccharide in an unmodified free form. The free monosaccharide is retrieved from the supernatant of the cultivated microorganism.